



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

***Aplicação de técnicas de biologia molecular  
no estudo da diversidade genética***

**Carla Cristina Santos Borges Fragoso**

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Grau de Mestre por Licenciados Pré-Bolonha, em Biotecnologia - Despacho 20/2010.

Monte da Caparica  
**Setembro de 2011**





**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

***Aplicação de técnicas de biologia molecular  
no estudo da diversidade genética***

**Carla Cristina Santos Borges Fragoso**

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Grau de Mestre por Licenciados Pré-Bolonha, em Biotecnologia - Despacho 20/2010.

Monte da Caparica  
**Setembro de 2011**



**Orientador externo:** Professora Doutora Ana Cecília Roque,  
Universidade Nova de Lisboa.

**Orientador interno:** Doutora Fernanda Paula Simões de Matos,  
Instituto Nacional de Recursos Biológicos.

© Carla Cristina Santos Borges Fragoso, FCT/UNL

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor”



## **Agradecimentos**

Um dia a maioria de nós irá separar-se.  
Sentiremos saudades de todas as conversas atiradas fora,  
das descobertas que fizemos, dos sonhos que tivemos,  
dos tantos risos e momentos que partilhámos.  
Saudades até dos momentos de lágrimas, da angústia, das  
vésperas dos fins-de-semana, dos finais de ano, enfim...  
do companheirismo vivido...

**Fernando Pessoa**

Homenagem aos bons e verdadeiros amigos que me têm acompanhado ao longo de toda a  
minha carreira profissional.

E a minha alma alegra-se com seu sorriso,  
um sorriso amplo e humano,  
como o aplauso de uma multidão...

**Fernando Pessoa**

Homenagem à minha mãe, pai, marido e filhos que são o meu sorriso. E obrigada a Deus.





### **Sumário da carreira**

Este relatório apresenta as áreas de maior impacto científico na carreira profissional da candidata. Encontra-se estruturado em 7 capítulos, tendo como área de investigação comum a aplicação de técnicas de Biologia Molecular, em que os marcadores moleculares (microssatélites) são utilizados transversalmente no estudo da diversidade genética de diferentes fontes biológicas.

O primeiro projecto consistiu na Construção de uma biblioteca genómica de *Quercus suber*, para a pesquisa de marcadores moleculares baseada em regiões repetitivas (VNTRs, microssatélites). (Borges 2002).

O segundo projecto desenvolve a análise genética de uma população bovina autóctone, Raça Algarvia, em risco de extinção. Este estudo produziu uma publicação (Ginja *et al.*, 2010).

O terceiro projecto baseou-se no estudo da variabilidade intra-populacional entre populações de cegonhas e sexagem em animais anilhados. Este estudo produziu duas publicações (Simões *et al.*, 2006) e (Fernandes *et al.*, 2006).

O quarto projecto incidiu sobre o desenvolvimento dos conhecimentos tecnológicos sobre fagoterapia como alternativa biológica aos antibióticos e ferramenta de segurança alimentar integrada na produção avícola e desenvolvimento de kits de diagnóstico com base na tecnologia de PCR.

O quinto projecto refere o desenvolvimento e utilização da técnica de detecção de SNPs ("polimorfismo de base única") pelo método "SNAPshot" em *Canis familiaris* e *Canis lupus signatus*. Este trabalho deu origem a uma publicação (Borges *et al.*, 2009).

O sexto e sétimo projecto têm como base o estudo da genotipagem da população de lobo Ibérico em Portugal, em que a candidata participou no parecer sobre o Aproveitamento Hidroeléctrico do Baixo Sabor (AHBS)-Programa de Protecção e Valorização do Lobo-ibérico no Nordeste Transmontano e Beira Alta. Neste momento a candidata está a processar os resultados da genotipagem com marcadores moleculares da população de lobo ibérico, em paralelo com a implementação de recolha de amostras dos animais domésticos atacados no campo.

**Termos-chave:** marcadores moleculares, microssatélites, genotipagem.



### **Career Summary**

This report presents the areas of scientific on the candidate career. It is structured in 7 chapters, with the common area of research the application of techniques of molecular biology, in which molecular markers (microsatellites) are used across the study of genetic diversity of different biological sources.

The first project involved the construction of a genomic library from *Quercus suber*, the search for molecular markers is based on repetitive regions (VNTRs, microsatellites). (Borges 2002). The second project develops a molecular genetic analysis of a cattle population to reconstitute the extinct Algarvia breed. This study produced a publication (Ginja *et al.*, 2010). The third project was based on the study of intra-population variability between populations ringed storks and their sexing. This study produced two publications (Simões *et al.*, 2006) and (Fernandes *et al.*, 2006).

The fourth project focused on the advance of technological knowledge on phage therapy, has a biological alternative to antibiotics and an integrated food safety tool in poultry production and development of diagnostic kits based on PCR technology.

The fifth project concerns the development and usage of technology to detect SNPs ("single-base polymorphism") with the "SNAPshot" method in *Canis familiaris* and *Canis lupus signatus*. This work has resulted in a publication (Borges *et al.*, 2009).

The sixth and seventh project are based on the study of population genotyping of the Iberian wolf in Portugal, in which the candidate participated in the report Hydroelectric of Baixo Sabor (AHBS)-Program of Protection and Improvement of the Iberian Wolf in Nordeste Transmontano and Beira Alta. At this time the candidate is processing the results of genotyping with molecular markers of the Iberian wolf population, in parallel with the implementation of a sampling kit used on attacked domestic animals directly on the field.

**Keywords:** molecular markers, microsatellites, genotyping.



## Introdução

A carreira profissional da candidata teve início em Outubro de 2002 após conclusão do curso de Química Aplicada, ramo de Biotecnologia na Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

Após a conclusão do estágio de final de curso, na área da Biologia Molecular, subordinado ao tema: Construção de uma biblioteca genómica de *Quercus suber* (Sobreiro), para a pesquisa de marcadores moleculares baseados em regiões repetitivas (VNTRs, microssatélites) para estudos de variabilidade genética na população de *Quercus suber*, no Grupo de Biologia Molecular do ex-INETI.

Em Novembro de 2003, em colaboração com a Direcção Geral de Veterinária participou no projecto: “Análise genética de uma população bovina autóctone (Algarvia), em risco de extinção”. Neste estudo pôde aplicar os seus conhecimentos em marcadores moleculares, nomeadamente microssatélites, para a caracterização genética molecular de animais com características morfológicas, que mais se aproximavam do padrão definido como o da raça bovina Algarvia, em herdades do Algarve e do Alentejo. A subsequente comparação dos dados alélicos dos mesmos loci para as raças bovinas autóctones portuguesas reconhecidas produziu uma publicação (Ginja *et al.*, 2010).

Em Junho de 2004, prestou serviços especializados na área da biologia molecular, serviço contratado a pedido da Dirección General de Medio Ambiente, Junta de Extremadura, Cáceres, Espanha. Em colaboração com o Instituto da Conservação da Natureza e Unité de Recherches en Zoogéographie, Institut de Zoologie, Liège, Belgium tendo cumprido os objectivos requeridos: avaliação da variabilidade intra-populacional (através do estudo do ADN mitocondrial e marcadores microssatélites) e determinação individual do sexo. Este estudo produziu duas publicações (Simões *et al.*, 2006) e (Fernandes *et al.*, 2006). Uma publicação adicional que inclui o estudo com microssatélites aguarda resultados complementares para submissão.

A partir de Agosto de 2007, a candidata participou no Projecto IDEIA: Empresa Controlvet/INETI: “Desenvolvimento dos conhecimentos tecnológicos sobre fagoterapia como alternativa biológica aos antibióticos e ferramenta de segurança alimentar integrada na produção avícola e desenvolvimento de kits de diagnóstico com base na tecnologia de PCR”. Neste projecto a candidata procedeu ao desenvolvimento de sondas, para diferenciação de fagos constituintes de misturas específicas, sequenciação e análise de genomas de fagos. Os produtos resultantes (misturas controladas de fagos) estão no momento, num projecto-piloto da CONTROLVET a serem comercialmente testados como sistemas de monitorização de controlo ou prevenção de infecções por *Salmonella*, em aviários (camas).

Em Maio de 2008, na sequência do plano de pós-doutoramento da doutora Elisabete Pires (INRB), foi proposto à candidata o estudo das linhas paternas de cães tendo como base o estudo de marcadores moleculares, nomeadamente SNPs (polimorfismo de base única). Neste âmbito, foi implementado pela candidata, no Grupo de Biologia Molecular, INRB, a técnica de detecção de SNPs pelo método “SNaPshot”, em base múltipla e aplicação do método para análise da diversidade genética e diferenciação de *Canis familiaris* (cão) e *Canis lupus* (lobo) no cromossoma -Y. Este trabalho deu origem a uma publicação (Borges *et al.*, 2009).

A partir de 2008, a candidata, em estreita colaboração com o Grupo Lobo, faz parte do estudo de monitorização da população de lobos (*Canis lupus*) existentes em Portugal, tendo como função, a optimização da metodologia de extracção de ADN a partir de amostras não invasivas (dejectos), desenvolvendo e implementando a metodologia inerente ao trabalho com amostras forenses, para posterior aplicação do estudo de marcadores moleculares em genotipagem de indivíduos, determinação de graus de parentesco e etologia animal perante barreiras físicas.

Numa primeira fase participou como consultora externa no 4º relatório parcelar referente aos trabalhos desenvolvidos no âmbito da Medida Compensatória MC8 do Aproveitamento Hidroeléctrico do Baixo Sabor (AHBS) - “Programa de Protecção e Valorização do Lobo-Ibérico no Nordeste Transmontano e Beira Alta.

O objectivo principal deste projecto foi individualizar genótipos e determinar graus de parentesco entre indivíduos, identificados através das análises genéticas, de modo a inferir o conhecimento de eventuais movimentos de lobos entre as duas margens do rio, por comparação de genótipos (iguais ou aparentados) em cada uma das duas margens.

A informação das análises genéticas em conjunto com a informação proveniente dos trabalhos executados em campo foi de extrema importância para conceber medidas adequadas para compensar o impacte que o AHBS causará na sua envolvente próxima, tendo presente o incremento da sua sustentabilidade na região do Baixo Sabor, no Nordeste Transmontano e na Beira Alta.

Neste momento, a candidata estará a processar os resultados obtidos através da genotipagem de amostras não invasivas recolhidas nas áreas de Alvão, Padrela, Bornes, Alto da Coutada, Montesinho e Sul do Douro.

Em simultâneo, a candidata está a participar num estudo, pioneiro em Portugal, que consiste em, através de estudos genéticos, provar cientificamente se um animal doméstico, foi atacado por lobo, informação que pode levar à indemnização do lesado. A metodologia desenvolvida permite aos técnicos especializados do Grupo Lobo, procederem à recolha de amostras de prejuízos, utilizando zangaratoas, após o ataque aos animais domésticos. Após a recepção de amostras no laboratório, a candidata efectua a genotipagem das amostras com base em 19 loci de microsatélites que permitem a diferenciação genética entre *Canis familiaris* e *Canis lupus signatus*.

**Índice**

Sumário da carreira .....	I
Career Summary .....	III
Introdução.....	V
Índice .....	VII
Índice de Tabelas .....	XI
<b>Capítulo 1</b> .....	1
1. Projecto de Investigação: FCT/ POCTI/AGR/39011/2001 .....	2
1.1. Competências adquiridas .....	2
1.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto .....	2
1.1.2. Apresentação dos resultados obtidos .....	6
1.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto .....	7
1.1.4. Indicadores de execução.....	8
<b>Capítulo 2</b> .....	11
2. Projecto de Investigação: Análise genética de uma população bovina autóctone, Raça Algarvia, em risco de extinção. ....	12
2.1. Competências adquiridas .....	12
2.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto .....	12
2.1.2. Apresentação dos resultados obtidos .....	14
2.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto .....	14
2.1.4. Indicadores de execução.....	14
<b>Capítulo 3</b> .....	17
3. Programa TRANSFAUNA INTERREG .....	18
3.1.Competências adquiridas .....	18
3.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto .....	18
Fase 1: Objectivo: obtenção de sequências de ADN mitocondrial .....	19
Fase 2: Objectivo: Amplificação e análise de fragmentos para efeitos de sexagem em animais anilhados .....	21
3.1.2. Apresentação dos resultados obtidos .....	21

3.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto .....	22
3.1.4. Indicadores de execução.....	23
<b>Capítulo 4</b> .....	25
4. Projecto IDEIA: Empresa Controlvet/INETI.....	26
4.1. Competências adquiridas .....	26
4.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto .....	26
4.1.2. Apresentação dos Resultados.....	29
4.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto .....	29
4.1.4. Indicadores de execução.....	29
4.1.4. Referências bibliográficas .....	29
<b>Capítulo 5</b> .....	31
5. Projecto de Investigação: Desenvolvimento e utilização da técnica de detecção de SNPs ("polimorfismo de base única") pelo método "SNAPshot" .....	32
5.1. Competências adquiridas .....	32
5.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto .....	32
5.1.2. Apresentação dos resultados .....	33
5.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto .....	34
5.1.4. Indicadores de execução.....	34
<b>Capítulo 6</b> .....	37
6. Programa de Protecção e Valorização do Lobo-Ibérico no Nordeste Transmontano e Beira Alta .....	38
6.1. Competências adquiridas .....	39
6.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto .....	39
6.1.2. Apresentação dos resultados .....	41
6.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto .....	42
6.1.4. Indicadores de execução.....	43
<b>Capítulo 7</b> .....	45
7. Projecto de Investigação: Genotipagem da população de lobo ibérico em Portugal .....	46
7.1. Competências adquiridas .....	47
7.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto .....	47
7.1.2. Apresentação dos resultados .....	48



7.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto .....	48
Outras Actividades na área Profissional: .....	49
Análise Crítica do Percurso Profissional e sua Adequação ao Grau de Mestre.....	50
<b>Anexos</b> .....	51



***Índice de Tabelas***

Tabela I - Iniciadores desenhados para amplificação de ADN mitocondrial.....	19
Tabela II - Material biológico utilizado.....	26
Tabela III - Sequência das sondas específicas para os fagos F1055S e F12013S....	28



# ***Capítulo 1***

## **1. Projecto de Investigação: FCT/ POCTI/AGR/39011/2001**

Construção de uma biblioteca genómica de *Quercus suber*, para a pesquisa de marcadores moleculares baseada em regiões repetitivas (VNTRs, microsatélites).

**Contextualização do projecto:** O *Quercus suber* (sobreiro), encontra no território português as condições ideais ao seu desenvolvimento, sendo por isso a 2ª espécie florestal mais representativa em Portugal, ocupando 21,5% da área florestal. Devido à importância da espécie de *Quercus suber*, para o nosso país, e com a evolução do progresso tecnológico na área dos polímeros (plásticos), a comercialização da cortiça, sofre uma grande ameaça. É com essa finalidade que surge este trabalho, a construção de uma biblioteca genómica de *Quercus suber*, para a pesquisa de marcadores moleculares, baseados em regiões repetitivas (microsatélites).

O trabalho centrou-se na área da Biologia Molecular. O estudo consistiu na construção de uma biblioteca genómica de *Quercus suber*, para a pesquisa de marcadores moleculares baseados em regiões repetitivas (VNTRs, microsatélites) e incluiu a extracção de ADN a partir de folhas de *Quercus suber* e optimização das condições de restrição para a obtenção de fragmentos de dimensão apropriada, selecção de fragmentos, ligação a “linkers”, amplificação por PCR, captura de fragmentos enriquecidos em microsatélites, clonagem e selecção de clones positivos. Por último procedeu-se à sequenciação dos clones positivos e análise de sequências.

Para consulta mais detalhada sobre o projecto consultar documentos inseridos no anexo I.

### **1.1. Competências adquiridas**

#### **1.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto**

##### ***Extracção de ADN total***

Esta etapa visa a obtenção de conteúdos intracelulares, onde estejam contidas as biomoléculas de interesse, neste caso o ADN, o que implica a ruptura de estruturas membranares. No caso do tecido das plantas, e nomeadamente do sobreiro, *Quercus suber*, são estruturas biológicas difíceis de romper, devido às suas paredes celulósicas, é necessário utilizar um método de disrupção mecânico (pilão/almofariz), para o efeito escolheram-se as folhas com aspecto mais fresco.

Para se extrair o ADN do tecido das plantas do *Quercus suber* utilizou-se o Kit “Mini Plant Dneasy” (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de ADN genómico foram misturadas e procedeu-se à precipitação com etanol.

**Digestão do ADN genómico**

A digestão do ADN genómico efectuou-se com a enzima de restrição *Mbol*, que reconhece uma sequência específica de bases, catalizando assim o corte nessa região.

**Ligação aos adaptadores**

Os adaptadores, são oligonucleótidos complementares que formam uma pequena cadeia dupla nucleotídica, que contém sítios de reconhecimento para uma ou mais enzimas de restrição. Neste trabalho, utilizou-se o adaptador SAULA/SAULB, que contém uma sequência na extremidade 5' que é complementar com a extremidade 3' produzida pela digestão do ADN genómico com a *Mbol*.

**Reacção da polimerase em cadeia (PCR)**

A reacção da polimerase em cadeia é uma técnica *in vitro*, que permite a amplificação de sequências específicas de ADN. A PCR inicia-se com a desnaturação do ADN molde a 95°C, seguido de um arrefecimento entre cerca de 40°C e 65°C, em que ocorre a hibridação dos iniciadores, que são pequenas sequências de oligonucleotídeos de 20 a 30 pares de bases que flanqueiam as regiões a amplificar, nos locais específicos. De seguida, ocorre um reaquecimento para 72°C, que é a temperatura óptima para a actividade da Taq polimerase, que a partir dos iniciadores dá início à adição dos nucleótidos. Este ciclo repete-se 20 a 40 vezes, obtendo-se assim, no final deste processo o ADN amplificado.

**Hibridação com as sondas**

Com o produto da 1ª PCR, procedeu-se à realização da hibridação com as sondas biotiniladas por complementaridade com estas.

**Captura do produto da PCR com esferas magnéticas**

Utilizou-se o sistema de captura DYNAL, Dynabeads M280 (Invitrogen) para a captura do produto de PCR, que hibridou com as sondas biotiniladas por complementaridade com estas.

**PCR da 1ª captura**

A amplificação pela PCR dos fragmentos de ácido nucleico capturado.

**2ª Hibridação**

Repetiu-se o processo de hibridação descrito anteriormente.

**2ª Captura**

Repetiu-se o processo de captura descrito anteriormente.

**PCR da 2ª captura**

Repetiu-se o processo descrito na 1ª amplificação dos fragmentos de ADN da captura.

**Digestão do produto da PCR com Mbol**

A enzima de restrição *Mbol*, corta numa determinada sequência de ADN específica (GATC), permitindo assim a separação do adaptador do ADN em estudo.

**Purificação da digestão do produto da PCR com Mbol**

Para efectuar a purificação do ADN, com o objectivo de eliminar o adaptador, utilizou-se o Kit Microspin<sup>TM</sup> Columns (Pharmacia Biotech).

**Ligação do ADN ao vector**

A ligação do ADN ao vector pUC19 foi efectuada com base nas suas extremidades coesivas *Bam*HI (Fermentas) desfosforiladas.

**Preparação de células competentes**

É necessário tornar as células competentes, isto é, susceptíveis de incorporar ADN heterólogo, na medida em que a molécula de ADN (sob a forma de plasmídeo), como é altamente hidrofílica, não atravessa a membrana da célula bacteriana. Uma das formas de tornar as células competentes, é o tratamento químico, com cloreto de cálcio, que cria as condições electrostáticas necessárias para precipitação do plasmídeo na parede celular, seguindo-se o aumento da permeabilidade da membrana, induzida pelo choque térmico de 1 min a 42°C, que vai facilitar a entrada do ADN na célula bacteriana.

**Transformação**

A transformação é uma técnica que se baseia na introdução de um plasmídeo dentro da bactéria e usar essa bactéria, para amplificar o plasmídeo e obter um elevado número de cópias deste. Todos os plasmídeos contêm: uma marca selectiva (um gene que codifica para a resistência a um antibiótico), uma origem de replicação (que é utilizado como ponto de partida, para a replicação do plasmídeo utilizando toda a maquinaria de replicação bacteriana) e um sítio múltiplo de clonagem (que contêm sequências de reconhecimento para 10 a 20 enzimas de restrição, é também o local onde se insere o ADN de interesse).



**Minipreparação de plasmídeo (Miniprep)**

Esta técnica permite a lise celular da *E. coli* e consequentemente a obtenção do plasmídeo com o fragmento de ADN inserido (no caso de clone positivo).

Previamente à realização da miniprep, inoculou-se cada colónia branca repicada, para tubos contendo 5 mL de meio LB e 2,5 µL de ampicilina (50mg/mL) e incubou-se durante a noite a 37°C, num agitador orbital a 15m r.p.m. Neste trabalho utilizou-se o Kit “Concert™ Rapid Plasmid” (GIBCOBRL<sup>R</sup>)

**Digestão do ADN plasmídico**

Sabendo que o pUC19 tem sequências específicas que são reconhecidas pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, esta digestão permite-nos a obtenção dos fragmentos inseridos e saber o seu peso molecular.

**Preparação do ADN para sequenciação pelo método do TempliPhi**

O “TempliPhi™ DNA amplification Kit” (GE Healthcare), foi desenvolvido especificamente para preparar moldes para sequenciação do ADN.

**Seleção de clones contendo microssatélites por hibridação**

A hibridação é um método de análise que permite identificar a presença de sequências homólogas de ácidos nucleicos, por complementaridade, utilizando sondas (sequências de nucleótidos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do ADN ou ARN, que se deseja identificar) que levam à produção de um sinal detectável. Para permitir a visualização da reacção entre as moléculas de ADN ou ARN em estudo e as sondas, estas podem ser associadas a moléculas radioactivas (método em desuso) ou biotiniladas, facilmente reconhecidas por outras moléculas (ex: anticorpo, estreptavidina), ligadas a enzimas (ex. fosfatase alcalina). Neste trabalho a detecção fez-se por colorimetria, em que se utiliza a enzima fosfatase alcalina conjugada com a estreptavidina que detecta a biotina das sondas marcadas com esta, e quando se fornece o substrato à enzima conjugada ocorre a produção de um sinal detectável.

**Hibridação da membrana com sondas de ADN marcadas com biotina**

Para se efectuar a hibridação da membrana com as sondas biotiniladas utilizou-se “Rapid-hyb buffer” (Amersham Life Sciences).

**Detecção por colorimetria do sinal**

Para a detecção por colorimetria do sinal, utilizou-se o kit-detecção de sondas de ácidos nucleicos marcados em membranas, dos laboratórios Vector<sup>®</sup>.

### 1.1.2. Apresentação dos resultados obtidos

Para o isolamento do ADN, foram utilizadas folhas jovens colhidas entre 2 a 8 semanas (Nascimento, 1998), em virtude da sua maleabilidade, menor rigidez, o que facilitou a extracção do ADN e o seu isolamento.

O método utilizado para a extracção do ADN, mostrou ser eficiente, na medida em que o ADN apresentava um baixo grau de degradação e ausência de ARN contaminante.

A estratégia adoptada neste trabalho, para a detecção de microssatélites, foi a realização de uma captura utilizando-se o sistema de captura DyNAL, Dynabeads M280 (Invitrogen).

Outra estratégia possível é a clonagem imediata de todo o ADN digerido no vector, após a digestão do ADN genómico, e só depois é que se realizava a selecção de clones contendo microssatélites.

A diferença essencial, que apresentam estas duas estratégias de detecção de microssatélites, é que a 1ª estratégia utiliza um sistema de captura, permitindo uma pré-selecção do ADN contendo microssatélites, o que facilita e restringe imenso a análise do ADN.

Embora a 2ª estratégia seja mais fácil e rápida, apresenta uma menor especificidade e a eficiência é mais baixa. Adopta-se esta estratégia, quando se pretende a construção de uma biblioteca com um número baixo de sequências de dinucleótidos ( $\leq 30$ ) (Schlötterer, 1998). Neste estudo, como se pretende a construção de uma biblioteca com o maior número possível de sequências repetitivas de dinucleótidos, utilizou-se a estratégia que incluiu a captura prévia de fragmentos enriquecidos em microssatélites (Schlötterer, 1998).

Estas estratégias, não nos permitem saber a localização cromossomal dos microssatélites isolados, o que de momento, não é relevante para a elaboração deste estudo.

Dos dois métodos utilizados para a preparação do ADN para sequenciar (Miniprep e TempliPhi), é preferível o TempliPhi, porque embora a nível económico sejam muito similares, o TempliPhi é um método de execução mais prático.

A realização prévia, da selecção de clones contendo microssatélites por hibridação (clones positivos), antes da reacção de sequenciação é vantajoso, na medida em que permitiu seleccionar os clones que contêm microssatélites (sinal positivo), daqueles que não o têm, o que restringe ainda mais a selecção. O que se torna vantajoso a nível económico.

A nível de resultados, dos 1200 clones recombinantes, cerca de 50% dos clones sequenciados de *Quercus suber*, continham microssatélites, embora ainda só tenham sido sequenciados 25 dos que deram sinal positivo, de todos os obtidos. Esta percentagem é bastante elevada se compararmos com estudos realizados em *Quercus myrsinifolia blume*, que de 3842 clones

recombinantes, apenas 39 deram sinal positivo e destes apenas 31 continham microssatélites (Isagi *et al.*, 1997). O que levou a supor que o ADN do *Quercus suber* possui um maior número de zonas repetitivas ao longo do genoma em comparação com o do *Quercus myrsinifolia blume*.

Por outro lado, nos clones sequenciados até à data, neste estudo, a predominância foi de sequências repetitivas dinucleotídicas (CA/GT), em contraste com as sequências repetitivas dinucliotídicas (GA/CT), o que é apoiado por outros resultados (não publicados), em *Quercus suber*. Embora, ainda haja muitas amostras para sequenciar, se estes resultados se comprovarem, esta espécie vem-se diferenciar das outras espécies do mesmo género, pois segundo estudos realizados nomeadamente em *Quercus macrocarpa* (Dow *et al.*, 1995), no *Quercus robur* (Steinkellner *et al.*, 1996) e em *Quercus petrea* (Steinkellner *et al.*, 1997), a maior predominância no seu genoma é de sequências repetitivas dinucliotídeas (GA/CT). Estes resultados se comprovados, sugerem que no *Quercus suber*, o marcador genético mais promissor é o (CA/GT), o mesmo acontecendo nos mamíferos (Lagercrantz *et al.*, 1993), em contraste com o (GA/CT) presente nas espécies acima mencionadas.

Outro resultado obtido neste trabalho, foi que todos os clones sequenciados até à data, são clones positivos individuais, o que quer dizer que todos eles possuem extremidades flanqueadoras diferentes, o que pode ser um bom índice da presença de polimorfismos. Estas extremidades flanqueadoras, podem ser utilizadas, em estudos posteriores, para a construção de iniciadores, para a PCR, permitindo o estudo de polimorfismos entre indivíduos da população de *Quercus suber*. Pode-se concluir, que a estratégia seguida para a construção da biblioteca genómica de *Quercus suber*, enriquecida em sequências repetitivas dinucleotídicas de (AC/TG)<sub>n</sub> e (AG/TC)<sub>n</sub>, foi eficaz, na medida em que se conseguiu otimizar as condições associadas à sua construção, permitindo-nos obter um número considerável de microssatélites.

### 1.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto

Foi construída pela primeira vez, à data referida anteriormente, uma biblioteca genómica de *Quercus suber*, para a pesquisa de marcadores moleculares baseados em regiões repetitivas (VNTRs, microssatélites) para estudos de variabilidade genética na população de *Quercus suber*.

Esta biblioteca permitiu a obtenção de microssatélites específicos de *Quercus suber*, que permitirá a utilização destes marcadores para análises de polimorfismos genéticos e estudos comparativos de variabilidade em termos de produção de cortiça, combate a pragas e outros factores bioquímicos e fisiológicos associados a esta espécie.

#### 1.1.4. Indicadores de execução

Borges C. (2002) "Construção de uma biblioteca genómica de *Quercus suber*, para a esquisa de marcadores moleculares baseada em regiões repetitivas (VNTRs, microssatélites) ". Tese de licenciatura. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 58pp.

Simões F., Borges C., Mendonça D., Matos J. (2006) "Microsatellite isolation from *Quercus suber*" GenBank Accession number:EF127969.

Simões F., Borges C., Mendonça D. Matos J. (2009). "Microsatellite isolation from *Quercus suber*" GenBank Accession number: GQ366706-GQ366793.

Borges C., Simões F., Mendonça D., Matos J. (2003) "Screening of *Quercus suber* Microsatellite locus using enriched libraries". I Encontro sobre Microssatélites e Genética de Populações, 16 a 17 de Junho, Lisboa.

Possante M., Simões F., Borges C., Mendonça D., Matos J., Amorim IR, Almeida H., Simões F., Pires AE., Rodrigues A., Almeida H. (2006). "Variabilidade genética e estruturação de 4 populações portuguesas de *Quercus suber*". IV Encontro Nacional de Marcadores Moleculares, 23 e 24 de Novembro, Vila Real.

Borges C., Simões F., Mendonça D., Matos J. (2004) "Screening of *Quercus suber* microsatellite locus using enriched libraries". XXXI Jornadas Portuguesas da Genética, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, 5 e 6 de Fevereiro, Oeiras.

Possante M., Silva J., Varandas M., Borges C., Mendonça D., Almeida H., Simões F., Pires A., Matos J. (2004) "Genetic Variability analysis of *Quercus suber* portuguese populations using microsatellites as molecular markers". II Encontro Nacional sobre Microssatélites e Genética de Populações/I Encontro Nacional sobre Marcadores Moleculares, Estação Agronómica Nacional, 23 e 24 de Setembro, Oeiras.

### 1.1.5. Referências bibliográficas

- Dow B.D., Ashley M.V., Howe H.F. (1995) Characterization of highly Variable (GA/CT)<sub>n</sub> Microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theor Appl Genet*, Vol. **91**, pp. 137-141.
- Isagi Y. and Dono S. (1997) PCR Primers Amplifying Microsatellite Loci of *Quercus myrsinifolia blume* and their conservation between oak species. *Molecular Ecology*, Vol. **6**, pp. 897-899.
- Lagercrantz U., Ellegren H., Andersson L. (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research*, **21**:1111-1115.
- Nascimento C. (1998) Análise de variabilidade Genética do Sobreiro com Vista ao Melhoramento e à Conservação dos Recursos Genéticos. Mestrado em Melhoramento de Plantas, Universidade de Évora, 128 p.
- Schlötterer C. (1998) Molecular Genetic Analysis of Populations. Edited by A. R. HOELZEL (Second Edition).
- Steinkellner H., Lexer C., Turetschek E., Glöss J. (1997) Conservation of (GA)<sub>n</sub> Microsatellite Loci between *Quercus* species. *Molecular ecology*, Vol. **6**, pp. 1189-1194.
- Steinkellner, H., Fluch S., Turetschek E., Streiff R., Kremer A., Burg K., Glössl J. (1996) Development of Microsatellite Loci from *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees*, pp. 217-222.



# ***Capítulo 2***

## **2. Projecto de Investigação: Análise genética de uma população bovina autóctone, Raça Algarvia, em risco de extinção.**

**Estudo baseado em análises genéticas, em colaboração com a Direcção Geral de Veterinária.**

**Contextualização do projecto:** Os objectivos principais do presente projecto foram, por um lado, a identificação de animais com características que se aproximavam do padrão definido como o da raça bovina Algarvia, em herdades do Algarve e do Alentejo e, por outro lado, avaliar a possibilidade de recuperação da raça, com base nos resultados da identificação. A defesa das raças autóctones, com preservação da diversidade morfológica e genética existentes, em especial das raças raras ou em vias de extinção, é uma preocupação que levou a Organização para a Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO/UNEP) a lançar em 1992, um programa internacional com o objectivo de salvaguardar e difundir a diversidade genética, inventariar os recursos de cada região, detectar as raças que se encontravam em perigo de extinção e estudar e propor a forma de as proteger (EAAP, 1993; Scherf, 1995). Paralelamente, os países membros da União Europeia incentivaram o desenvolvimento de acções visando o melhoramento e conservação das raças autóctones no seu habitat original (Sobral *et al.*, 2005). Para produzir cada vez mais e melhor, é necessário, em primeiro lugar, conhecer as nossas raças autóctones e, saber quais as suas reais capacidades. O problema começa, desde logo, por saber que raças existem e como surgiram. A caracterização e estudo da originalidade de uma raça podem ser feitos, actualmente, a partir da análise morfológica, das aptidões produtivas, do perfil genético. Foi efectuado o estudo da diversidade morfológica e genética de quarenta e três fêmeas e 4 machos, referenciados pela Direcção Regional de Agricultura do Algarve e/ou indicados por antigos criadores da raça Algarvia apresentando características morfológicas próximas dos critérios que definiram, no passado, o padrão da raça bovina Algarvia.

Para consulta mais detalhada sobre o projecto consultar documentos inseridos no anexo II.

### **2.1. Competências adquiridas**

#### **2.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto**

Os animais das diversas raças incluídas neste estudo foram previamente amostrados em 10 raças bovinas autóctones Alentejana (50 indivíduos), arouquesa (50), Barrosã (50), Brava de Lide (40), Minhota (50), Marinhola (51), Maronesa (47), Mertolenga (50) e Mirandesa (50) e 3 raças exóticas Charolês (45), Frisia (35) e Limousine (48).



**Animais amostrados**

Relativamente aos bovinos da população Algarvia, foram recolhidas amostras de 47 Indivíduos (42 fêmeas e quatro machos) seleccionados com base numa caracterização morfológica prévia por métodos de taxonomia numérica (Sobral *et al.*, 2005).

Adicionalmente, amostras de raça Garvonesa (29 indivíduos) e de Preta (47 indivíduos) foram recolhidas devido à sua presença característica na região sul de Portugal, não podendo ser excluídos cruzamentos com a raça Algarvia.

**Extracção do ADN**

O ADN genómico foi extraído dos leucócitos usando Puregene (Gentra Systems, Minneapolis, EUA).

**Amplificação de loci de microssatélites por técnicas de PCR**

Um conjunto de 27 marcadores microssatélites (*BM1818*, *BM1824*, *BM203*, *BM2113*, *BM2613*, *BRRIBO*, *CSSM36*, *CYP21*, *ETH10*, *ETH152*, *ETH225*, *ETH3*, *HEL11*, *HEL13*, *HEL9*, *ILSTS035*, *ILSTS065*, *INRA023*, *MGTG4B*, *RM006*, *RM067*, *SPS115*, *TGLA122*, *TGLA126*, *TGLA227*, *TGLA345* e *TGLA53*) foi usado para genotipar cada animal. Foram realizadas PCRs Multiplex como descrito por Mateus *et al.*, (2004).

**Sequenciação**

Os produtos do PCR foram separados por eletroforese capilar num sequenciador ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e a análise dos fragmentos foi feita com o software STRand (Hughes, 2000).

A análise genética da população de bovinos *Algarvios* foi realizada através de microssatélites, com base em 27 loci previamente genotipados em 10 raças bovinas autóctones e 3 raças exóticas (Ginja, 2002). Amostras de referência foram incluídas em todos os ensaios de PCR para padronizar o dimensionamento dos alelos no conjunto de dados.

**Análise estatística dos dados**

Foram calculadas frequências alélicas e valores de heterozigotia, a análise do desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, o cálculo das distâncias genéticas com análise multivariada. Os resultados são apresentados na forma de dendogramas.

### 2.1.2. Apresentação dos resultados obtidos

Com base na análise genética efectuada dos animais amostrados, o conjunto de marcadores moleculares considerado possibilitou a identificação de indivíduos característicos da população de bovinos Algarvios, que se destacou das outras raças amostradas. No entanto, mostrou ter menor diferenciação genética em relação aos animais da raça Alentejana. Estes resultados correlacionaram-se positivamente com os dados fenotípicos.

### 2.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto

Estes resultados confirmam a existência de uma população bovina autóctone, a raça Algarvia, com um nível importante de variabilidade e polimorfismo, a nível morfológico e genético, quer entre animais pertencentes à população, quer em relação a animais de outras raças.

Um total de 21 animais compostos por 18 fêmeas e 3 machos apresentam-se como bons candidatos enquanto núcleo de partida de recuperação da raça bovina Algarvia, hoje em extinção.

### 2.1.4. Indicadores de execução

Ginja C., Sobral M.F., Figueiredo T.R., Matos J., Borges C., Penedo M.C., Cravador A. (2010) Molecular genetic analysis of a cattle population to reconstitute the extinct Algarvia breed. *Genetics Selection Evolution*, vol. **42**:18.

Sobral M.F., Navas D., Roberto C., Palmilha I., Pereira P., Borges C., Simões F., Matos J., Cravador A. (2004) "Análise morfológica e genética de uma população bovina autóctone (Algarvia), em risco de extinção". IV Congresso Ibérico Sobre Recursos Genéticos Animais, SPREGA, 15 a 17 de Setembro, Ponte de Lima.

Sobral M.F., Navas D., Roberto C., Palmilha I., Chumbinho J., Lima M.B., Borges C., Simões F., Ginja C., Matos J., Rangel T., Matos J., Cravador A. (2004) "Is Algarvia Cattle Breed Really Extinct?". II Encontro Nacional sobre Microsatélites e Genética de Populações e I Encontro Nacional sobre Marcadores Moleculares, Estação Agronómica Nacional, 23 e 24 de Setembro, Oeiras.

### 2.1.5. Referências bibliográficas

- EAAP, (1993) *Genetic Diversity of European Livestock Breeds*. Working Group on Animal Genetic Resources. Simon D.L. & Buchenauer D. (eds). EAAP Publication n.º 66. Wageningen Pers, The Netherlands.
- Ginja C. (2002) Identificação de raças bovinas Portuguesas através da utilização de marcadores moleculares". Dissertação de Mestrado. UTAD, Vila Real.
- Hughes S.S. (2000) *STRand* Nucleic Acids Analysis Software. 1.2.90 edition;
- Mateus, J.C., Penedo M.C.T., Alves V.C., Ramos M., Rangel-Figueiredo T. ( 2004) Genetic Diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics*, **35**: 106–113.
- Scherf B.D. (1995) "*World Watch List for Domestic Animal Diversity*". Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2<sup>nd</sup> Ed. Rome.
- Sobral F. (2005) "Recuperação da raça bovina algarvia". Relatório de Final, INIAP, Universidade do algarve e Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas Eds. 58 pp.



# ***Capítulo 3***

### **3. Programa TRANSFAUNA INTERREG**

**Prestação de serviços especializados na área da biologia molecular, por contrato, a pedido da Dirección General de Medio Ambiente, Junta de Extremadura, Cáceres, Espanha II.**

**Contextualização do projecto:** A Cegonha-Preta (*Ciconia nigra*) nidifica na Eurásia temperada desde a Península Ibérica até ao Leste da Sibéria e China, e também na África Austral (AEWA, 2000). São reconhecidas diferentes populações nidificantes, sendo uma das mais pequenas na Península Ibérica (cerca de 450 casais). Esta população ibérica está aparentemente isolada o que lhe poderá conferir diferenciação do ponto de vista genético.

A população ibérica migra para o Norte de África (Marrocos, Argélia) e África Ocidental (da Nigéria ao Chade) onde poderá juntar-se a indivíduos oriundos da população da Europa Central e de Leste, mas as populações nidificantes não se misturam, não havendo observações de animais nidificantes em Portugal e Espanha oriundos de outra população europeia.

O isolamento da população ibérica poderá estar relacionado com o declínio acentuado dos efectivos nidificantes na Europa Ocidental e Central, no séc. XIX, que levou à extinção local da espécie na Bélgica, Dinamarca e Suécia. Estes desaparecimentos que criaram uma maior descontinuidade na distribuição europeia de Cegonha-Preta, poderão relacionar-se com uma eventual perda de variabilidade genética da espécie. Por outro lado, poderá colocar-se a hipótese de uma população ibérica geneticamente diferente e possuidora de um pool genético único, representativo de uma variação original na espécie.

Os principais objectivos deste projecto foram a avaliação da variabilidade intra-populacional e determinação individual do sexo. Numa 1ª fase, desenharam-se e testaram-se iniciadores para a região controlo do ADN mitocondrial, para obtenção de sequências de ADN mitocondrial.

Numa 2ª fase, foi feita a sexagem de indivíduos anilhados de 2003 a 2005 incluindo cegonhas seguidas por satélite nos seus movimentos dispersivos e de migração.

Para consulta mais detalhada sobre o projecto consultar documentos inseridos no anexo III.

#### **3.1. Competências adquiridas**

##### **3.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto**

###### **Material biológico**

O material biológico consistiu em amostras de penas e sangue de animais oriundos, de Portugal, Espanha, Polónia, Letónia e Bélgica.

### **Extracção de ADN**

A metodologia de extracção de ADN é comum às duas fases previamente identificadas, tendo sido realizada consoante o tipo de amostra: tecido, sangue ou penas. Usou-se um kit de extracção da Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel) com algumas modificações ao protocolo recomendado de forma a otimizar a extracção de acordo com a amostra e com base em experiências anteriores (Segelbacher, 2002; Pires e Fernandes, 2003).

De forma a prevenir contaminações, usaram-se salas distintas para os diversos passos de processamento das amostras no laboratório, diferentes batas, pipetas e reagentes.

### **Fase 1: Objectivo: obtenção de sequências de ADN mitocondrial**

#### **Amplificação de ADN**

Seleção de Iniciadores: os iniciadores testados para a amplificação de zonas da região D-Loop mitocondrial de *Ciconia nigra* foram desenhados a partir do emparelhamento de sequências de D-Loop mitocondrial de *Ciconia ciconia* (AB026818) e *Ciconia boyciana* (AB026193), utilizando o algoritmo BLAST. Foram escolhidas as zonas mais variáveis que flanqueavam as sequências da região D-loop de *Ciconia*.

Tabela I- Iniciadores desenhados para amplificação de ADN mitocondrial.

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequências</b>
102F	5'-GCATTAAGTTGCTTGTCCGC-3'
201F	5'-ATGATGCGTGGATAAATACTG-3'
508R	5'-TCATATCCAGCTACCATTC-3'
532R	5'-AGATACCATGGCCAGCTACC-3'
1267R	5'-GAATAGGTGAAAGGAACC-3'
12SR	5'-CTGGGGCATTACTGTTGG-3'

Foram utilizadas as combinações dos iniciadores 201F/532R, 102F/532R, 102F/538R e 102F/1267R, com vista à amplificação de amplicões com um tamanho entre 300-400pb.

Posteriormente, usou-se o par 102F/12SR para amplificar uma região de ADN mitocondrial de cerca de 2000 pb (que incluiu quase a totalidade do D-loop) para confirmação da origem mitocondrial dos fragmentos de 400 bp.

**Reamplificação a partir de bandas no gel**

Sempre que a partir de uma reacção de PCR se obtinham bandas múltiplas de tamanho próximo, estas foram picadas a partir do gel e utilizadas como ADN molde para reacções de amplificação individuais. As bandas individualizadas obtidas foram então utilizadas para clonagem.

**Clonagem de genes e selecção de recombinantes**

Os produtos de PCR obtidos para cada amostra foram separados por electroforese e reamplificados isoladamente. Os produtos amplificados individualizados foram então clonados em vector pTZ57R/T, InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit (Fermentas) e introduzidos em *E. coli* DH5α.

Os transformantes foram seleccionados por crescimento em placas de meio suplementado com X-Gal (25 mg/ml) e ampicilina (100 mg/ml). As colónias recombinantes, colónias brancas contendo os fragmentos de interesse, foram analisados por técnicas de PCR (utilizando os iniciadores de amplificação), para confirmação da presença dos fragmentos pretendidos. Os clones positivos foram então inoculados em meio de Luria-Bertani, líquido suplementado com ampicilina.

**Minipreparação de plasmídeo (Miniprep).**

Após crescimento bacteriano, o ADN plasmídico dos clones recombinantes foi extraído utilizando o kit GFX Micro Plasmid Prep (Amersham Biosciences) e, posteriormente, analisados por sequenciação.

**Sequenciação de ADN**

O ADN plasmídico recombinante foi sequenciado num sequenciador automático ABI PRISM 310.

As sequências obtidas, foram analisadas utilizando o algoritmo BLAST para seleccionar qual ou quais as bandas apresentavam semelhança com as sequências do D-Loop de Cegonha-Branca, existentes em banco de dados. Os alinhamentos múltiplos foram efectuados utilizando o programa Multalin (version 5.4.1).



## **Fase 2: Objectivo: Amplificação e análise de fragmentos para efeitos de sexagem em animais anilhados**

### ***Amplificação de ADN***

Para efeitos de sexagem utilizou-se numa primeira fase os iniciadores (SEXF/SEXR) desenvolvidos para amplificar uma região do cromossoma Z da cegonha oriental (Itoh *et al.*, 1997) presente apenas nas fêmeas.

Numa 2ª fase utilizaram-se os iniciadores P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') e P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG- 3') descritos por Griffiths *et al.*, (1998), de forma a confirmar os resultados. Apesar destes iniciadores amplificarem para amostras de Cegonha-Preta, a presença de banda dupla carecterística das fêmeas não era visível, tendo que se proceder à digestão do produto de PCR com enzimas de restrição.

### ***Digestão dos produtos de PCR***

Os produtos de PCR amplificados com os iniciadores (P2/P8), foram digeridos com enzimas de restrição *Asp700* ou *HaeIII* (Roche) (Sacchi *et al.*, 2004).

## **3.1.2. Apresentação dos resultados obtidos**

### ***Fase 1: Amplificação e análise de fragmentos do D-loop de ADN mitocondrial***

A zona controlo do ADN mitocondrial, já conhecida, é muito semelhante entre Cegonha-Branca e Cegonha-Branca oriental. Os resultados apresentados permitiram concluir a existência de uma acentuada diferenciação genética da Cegonha-Preta relativamente a estas espécies, em particular em relação à Cegonha-Branca. Esta diferença é evidente quando analisamos o alinhamento das sequências, em que se verifica a inserção de um fragmento de 22 bases presentes nas outras espécies de cegonha (*C. ciconia* e *C. boyciana*) e não na *C. nigra*.

De facto Slika, (1997) na sua análise filogenética da família Ciconidae, a partir de zona do citocromo b, posicionou a Cegonha-Preta isolada, e mais próxima de outras espécies de *Ciconia* como a *C. abdimii*, a *C. stormi* e a *C. episcopus*. Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram esta evidência, já que através da análise das sequências se verificou uma grande divergência entre os fragmentos de ADN mitocondrial de Cegonha-Branca (*Ciconia ciconia* e *Ciconia boyciana*) e de Cegonha-Preta. A Cegonha-Branca estará mais próxima de *Ciconia boyciana*, tal como também dados mais recentes de zona controlo do ADN mitocondrial revelam (Yamamoto *et al* 2000). Assim, e tal como Slikas, (1997) refere, apesar de classificações prévias considerarem Cegonha-Branca e Cegonha-Preta espécies pares, e apesar de sobrepor a sua distribuição na Europa ocidental, os dados moleculares contradizem tal proximidade.

Entre as várias amostras de Cegonha-Preta analisadas, a elevada percentagem de identidade presente nos fragmentos das amostras sequenciadas não parece apresentar grandes diferenças que possam levar à sua utilização em análise de populações intra-específicas. Nesta análise, as diferenças obtidas não parecem corresponder a determinada origem populacional.

Numa discussão preliminar destes resultados, poderá sugerir-se que a ausência de diferenciação genética poderá pôr em causa alguns pressupostos relativos à ecologia comportamental da espécie. Existe uma ideia generalizada de que a Cegonha-Preta seja filopátrica, isto é, todos os indivíduos regressam ao seu local de nascimento para reprodução e, portanto, os pares serão formados dentro da mesma população. Esta característica teria levado a uma estruturação populacional que se espelharia em diferenciação genética, hipótese inicial neste estudo. Os dados preliminares obtidos e aqui apresentados indicam o contrário, não se encontraram diferenças coincidentes com diferentes populações europeias. Se estes resultados se confirmarem, a ausência de diferenciação genética, põe em causa a filopatria ou, avança pelo menos a hipótese de existirem alguns animais que não exibam esse comportamento. De facto, um pequeno número de migrantes é suficiente para impedir divergência significativa entre populações (Hartl, 1987). Provavelmente na Cegonha-Preta, 2 a 4 indivíduos em cada 3 a 4 anos (tempo geracional) terá sido suficiente para não se observar diferenciação genética nas amostras disponíveis de diferentes populações reprodutoras – Península Ibérica, Polónia, Letónia, Bélgica. Existem também outros dados de estudos de ecologia (não publicados) que apontam para movimentos de Cegonha-Preta na ordem dos 400 km. Desconhece-se se tais movimentos são frequentes nas populações e se seriam mais extensos e suficientes para manter o contacto entre populações ibéricas e as outras da Europa central e oriental.

#### *Fase 2 – sexagem em animais anilhados*

Em relação à sexagem considerou-se que o método de Griffiths *et al.*, (1998), obtinha melhores resultados, por ser mais fiável e por apresentar resultados também para os machos.

#### **3.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto**

Os resultados deste projecto são determinantes para a gestão de áreas naturais importantes. A perturbação humana e a alteração do habitat são as principais ameaças a esta espécie. A protecção específica de áreas de nidificação ligada ao conhecimento de eventual subestruturação da população é uma acção fundamental para a conservação da Cegonha-Preta. As análises moleculares são instrumentos poderosos no reconhecimento de subespécies e unidades de conservação, que pela sua diferenciação requerem gestão distinta.

Determinar geneticamente o sexo de indivíduos fornece informação complementar a todos os estudos ecológicos e de reprodução, o que não é possível apenas com base na morfologia dos animais.

#### 3.1.4. Indicadores de execução

Simões F., Borges C., Caballero J., Franco C., Matos J., Fernandes M. (2006) D-loop deletion in the mitochondrial DNA of the Black Stork *Ciconia nigra*. *Biota* **7** (1/2): 89-92.

Fernandes M., Borges C., Caballero J., Pacheco C., Franco C., Fernandes M. (2006). Molecular sexing of the Black Stork *Ciconia nigra*: sex ratios in the Portuguese population. *Biota* **7**(1-2): 31-36.

Fernandes M., Borges C., Simões F., Caballero J., Pacheco C., Franco C., Michaux J., Libois R. (2004). Genetic Study Of Black Stork: Project Description And Preliminary Results. 4th International Conference on the Black Stork (*Ciconia nigra*) Dávod-Püspökpuszt, 15 a18 de Abril, Hungria.

Fernandes M., Simões F., Borges C., Pacheco C., Franco C., Michaux J., Libois R. (2004) Estudo genético da Cegonha-Preta: Apresentação do projecto e dados preliminares de ADN mitocondrial. Jornadas de Conservação de Fauna Transfronteiriça, 23 e 24 de Novembro, Cáceres.

#### 3.1.5. Referências bibliográficas

Griffiths R., Double MC., Orr D., Dawson R.J.G. (1998) A DNA test for most birds. *Molecular Ecology* **7**:1071-1075.

Hartl D.L. (1987). "A primer of population genetics". 2<sup>nd</sup> Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 305pp.

Itoh Y., Ogawa A., Murata K., Hosoda T., Mizuno S. (1997) Identification of the sex of oriental white stork *Ciconia boyciana* by the polymerase chain reaction based on its sex chromosome specific DNA sequences. *Genes Genet. Syst.* **72**: 51- 56.

Pires A.E. e Fernandes M. (2003). Last lynxes in Portugal? Molecular approaches in a pre-extinction scenario. *Conservation Genetics*. **4**: 525-532.

Sacchi P., Soglia D., Maione S., Meneguz G., Campora M., Rasero R. (2004) A non-invasive test for sex identification in short-toed Eagle (*Circaetus gallicus*). *Mol Cell Probes* **18**:193–196.

Segelbacher G. (2002) Non-invasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. *Molecular Ecology Notes*. **2**: 367-369.

Slikas B. (1997) Phylogeny of the Avian family ciconidae (storks) based on cytochrome b sequences and DNA-DNA hybridization distance. *Molecular phylogenetics and evolution*. **8**:275-300.

Yamamoto Y., Murata K.M., Matsuda H., Hosoda T., Tamura K., Furuyama J. (2000) Determination of the complete nucleotide sequence and haplotypes in the D-loop region of the mitochondrial genome in the Oriental white stork, *Ciconia boyciana*. *Genes Genet. Syst.* **75**:25-32.

AEWA - Agreement on the Conservation of African-Eurasian Migratory Waterbirds  
<http://www.unep-aewa.org/>.

# ***Capítulo 4***

#### 4. Projecto IDEIA: Empresa Controlvet/INETI

Desenvolvimento de conhecimentos tecnológicos sobre Fagoterapia como alternativa biológica aos antibióticos e ferramenta de Segurança alimentar integrada na produção avícola e desenvolvimento de kits de diagnóstico com base em PCR (2007-2008).

**Contextualização do projecto:** Desenvolvimento tecnológico no âmbito da fagoterapia visando a redução de antibióticos na produção pecuária. Os bacteriófagos são vírus que existem naturalmente e infectam bactérias destruindo-as. São específicos para uma determinada espécie bacteriana, são geralmente inócuos para os animais e para o homem e são auto-limitantes, pois interrompem a sua multiplicação quando a sua população alvo é destruída. O desenvolvimento de soluções tecnológicas que permitam a utilização de fagoterapia na prevenção e tratamento de espécies bacterianas pode ser assim uma ferramenta importante em áreas como a segurança alimentar e produção animal, entre outras. Este projecto incluiu a pesquisa de bacteriófagos, métodos de isolamento, produção e conservação de fagos para o controlo e/ou prevenção de infecções microbianas por *E. coli* em aves. O estudo consistiu na caracterização molecular dos fagos pela utilização de marcadores de RAPD, sequenciação de ADN do genoma completo de dois fagos e concepção de sondas para aplicação em técnicas de PCR (PCR de tempo real) para identificação e controlo dos fagos incluídos no produto resultante (mistura controladas de fagos) para fagoterapia.

Para consulta mais detalhada sobre o projecto consultar documentos inseridos no anexo IV.

#### 4.1. Competências adquiridas

##### 4.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto

##### **Material biológico**

Tabela II- Material biológico utilizado.

Hospedeiro(H)	Fago(F)	Hospedeiro	Material Genético
1055	F1055S	Salmonella	dsDNA
12013	F12013S	Salmonella	dsDNA

### **Extracção do ADN**

Para a extracção do ADN dos fagos F1055S E F12013S, utilizou-se o Lambda Midi Kit (Qiagen), com algumas modificações ao protocolo de forma a optimizar a extracção.

### **Amplificação de fragmentos**

Para a amplificação do ADN extraído dos fagos, utilizou-se um conjunto de 39 iniciadores de RAPD. Estes iniciadores, também foram testados para a amplificação do ADN dos hospedeiros, de forma a poder seleccionar os fragmentos de interesse (só amplificados nos fagos). Todas as reacções foram monitorizadas por electroforese em gel de agarose.

Para além da amplificação do ADN extraído com os iniciadores de RAPD, seguiu-se ainda outra estratégia, de maneira a potenciar o aumento do número de fragmentos obtidos para cada um dos fagos.

### **Digestão do ADN genómico**

Esta estratégia, consistiu em digerir o ADN genómico dos fagos com várias enzimas de restrição, de maneira a obter o maior número de fragmentos digeridos. A escolha das enzimas teve como base sitios de restrição de sequências do fago KS7. As enzimas escolhidas foram: *Bam*HI, *Eco*RV, *Bgl*II, *Mbo*I, *Kpn*I, *Hind*III e *Sma*I.

### **Clonagem de fragmentos e selecção de recombinantes**

Para os fragmentos obtidos da digestão com as várias enzimas, nomeadamente os digeridos com *Sma*I e *Eco*RV (como se obtém extremidades rombas) procedeu-se á ligação ao vector pUC18, posteriormente digerido com *Sma*I (extremidades rombas).

Para os fragmentos digeridos com a enzima *Hind*III, procedeu-se á sua ligação ao vector pUC18 digerido posteriormente com *Hind*III.

No caso dos produtos de PCR obtidos pela amplificação por RAPD, foram clonados com o kit InsT/Aclone™ PCR Product Cloning (Fermentas). Por fim, procedeu-se á transformação em *E.coli* JM109.

Os transformantes foram seleccionados por crescimento em placas de meio suplementado com X-Gal, IPTG e ampicilina. Os recombinantes positivos, colónias brancas contendo os fragmentos de interesse, foram inoculados em meio Luria-Bertani líquido, suplementado com ampicilina.

### **Minipreparação de plasmídeo (Miniprep).**

Após crescimento bacteriano, o ADN plasmídico dos clones recombinantes foi extraído utilizando o kit Plasmid DNA purification kit, DNA-Spin™ (iNtRON).

### Sequenciação de ADN

Para a sequenciação do ADN plasmídico recombinante utilizou-se o sequenciador automático ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

### Análise de sequências

As sequências obtidas foram analisadas utilizando o algoritmo BLAST para seleccionar as que apresentavam semelhança com as sequências existentes em banco de dados. Os alinhamentos múltiplos foram efectuados utilizando o programa Sequencher<sup>TM</sup> 4.2.2 alias, e a partir daqui, desenharam-se as sondas, que se encontram na tabela III.

Tabela III- Sequência das sondas específicas para os fagos F1055S e F12013S.

Fago	Sonda	Sequência	Tamanho esperado (bp)
F1055S	F10S2	5`-CGCCGCTCAATACACTACCGG-3`	407
	RS2	5´-GCCCCCGCGAACCGATACCC-3´	
	<b><u>Sonda 2</u></b>		
F12013S	F12S1	5´-TGGATGAGACCTTAGCCGC-3´	233
	RF12S1	5´-TGTGCAACCGGCGGATGTGC-3´	
	<b><u>Sonda 1</u></b>		
	F12S2	5´-TGCTGCCCAATACTCGACGGG-3´	407
	RS2	5´-GCCCCCGCGAACCGATACCC-3´	
	<b><u>Sonda 3</u></b>		

### Amplificação do ADN com as sondas

Para otimizar a reacção de PCR fez-se um gradiente de temperaturas em que se fez variar a temperatura de emparelhamento, de 55°C a 58°C, e posteriormente todas as reacções foram monitorizadas por electroforese em gel de agarose.

De maneira a verificar a especificidade das sondas para cada um dos fagos de *Salmonella*, teve que se ter em conta, se eventualmente estas zonas se encontravam no hospedeiro (H1055S e H12013S). Além disso, outro dos problemas que poderia ocorrer, era se perante uma cultura mista (além dos fagos de *Salmonella*) estivessem presente fagos de *E. coli* (F1, F4, F8 e FN) e os respectivos hospedeiros (HF1, HF4, HF8 e HFN), ocorreria amplificação do fragmento com o tamanho esperado para o fago. Finalmente procedeu-se á amplificação do ADN dos fagos com as sondas. Todas as reacções foram monitorizadas por electroforese em gel de agarose.



Para garantir a especificidade e evitar o aparecimento de subprodutos, utilizou-se a Immomix (Bioline) e aumentou-se a temperatura de emparelhamento para 65°C.

#### **Purificação dos produtos de PCR**

Estes produtos de PCR, foram purificados com EXOSAP-IT PCR clean-UP (Fermentas).

#### **4.1.2. Apresentação dos Resultados**

Foram desenvolvidas 3 sondas que ao serem aplicadas ao ADN dos fagos em estudo, provaram ser específicas individualmente para cada fago. Para a sonda 1, obtêm-se um fragmento para o fago F12013S por volta dos 250pb (conforme esperado), não ocorrendo amplificação de nenhuma região do ADN do fago F1055S. No caso da sonda 2, obtêm-se um fragmento de 400pb apenas para o fago F1055S. Por fim, para a sonda 3 temos um fragmento também de 400pb, exclusivamente para o fago F12013S. Os fragmentos estudados por sequenciação vieram confirmar mais uma vez, que estas sondas são específicas para cada um dos fagos e que os diferencia entre si.

#### **4.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto**

Estes produtos estão no momento a ser comercialmente testados num projecto-piloto da CONTROLVET, como sistemas de monitorização de controlo ou prevenção de infecções por *Salmonella*, em aviários (camas).

#### **4.1.4. Indicadores de execução**

Borges C. (2007) Fagoterapia. Relatório de Actividades.

#### **4.1.4. Referências bibliográficas**

Grimont H.F. e Weil F.X. (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9 ed. Institut Pasteur.

Hagens S., Loessener M.J. (2007) Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **76**(3): 513-519.

Higgins J.P., Andreatti Filho R.L., Higgins S.E., Wolfenden A.D., Tellez G., Hargis B.M. (2008) Evaluation of *Salmonella*-lytic properties of bacteriophages isolated from commercial broiler houses. *Avian Diseases*. **52**:139–142.

Higgins, J.P.; Higgins, S.E.; Guenther K.L.; Huff W.; Donoghue A.M., Donoghue D.J.; Hargis B.M. (2005) Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry. *Poultry Science*, **84**:1141–1145.



# ***Capítulo 5***

## **5. Projecto de Investigação: Desenvolvimento e utilização da técnica de detecção de SNPs (“polimorfismo de base única”) pelo método “SNAPshot”**

O Grupo de Biologia Molecular teve participação activa na concepção e realização de um trabalho de doutoramento (Dra Elisabete Pires INRB), que reuniu informação molecular sobre a diversidade genética e diferenciação em raças portuguesas de cães autóctones, incluindo a determinação de linhas maternas (Pires, 2006 ). Na sequência do plano de pós-doutoramento da doutora Elisabete Pires, (INRB) propôs-se o estudo das linhas paternas de cães. Neste âmbito, foi implementado pela candidata a técnica de detecção de SNPs (“polimorfismo de base única”) pelo método “SNaPshot” Este trabalho foi financiado pelo GRUPO LOBO.

Este trabalho foi executado em duas fases:

Fase 1. Desenvolvimento do método detecção de SNPs (“polimorfismo de base única”) pelo método “SNAPshot.

Fase 2. Aplicação do método para análise diversidade genética e diferenciação de *Canis familiaris* e *Canis lupus* no cromossoma Y.

Para consulta mais detalhada sobre o projecto consultar documentos inseridos no anexo V.

### **5.1. Competências adquiridas**

#### **5.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto**

##### ***Material Biológico***

Para este estudo utilizou-se amostras de sangue ou tecido de 18 cães machos não relacionados, entre 9 raças autóctones portuguesas, 5 espécimes de raças de cães de Espanha e do Norte de África, 5 cães mongrel e dois lobos do sexo masculino.

As amostras de lobo foram obtidas a partir de animais em cativeiro mantidas no Centro de Recuperação do Lobo Ibérico (Portugal).

##### **Extracção do ADN**

Para a extracção de ADN do sangue ou tecido utilizou-se o Kit Nucleo Spin Blood quick puré (Macherey Nagel).

**Amplificação do ADN do cromossoma-Y por técnicas de PCR**

Os iniciadores usados para a amplificação das sequências genómicas do cromossoma-Y e as reacções de extensão SNAPshot foram todos desenhados utilizando (Primer3 software) de acordo com as recomendações SnapShot kit. Para o efeito foram usadas sequências modelo do Genbank -12 segmentos do cromossoma-Y de cão doméstico (Accession numbers DQ973626-DQ973805), previamente descritas por Natanaelsson *et al.* (2006).

A amplificação por PCR foi realizada para cada fragmento do cromossoma -Y, para todos os loci.

**Purificação dos produtos de PCR**

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados para remover iniciadores e dNTPs não incorporadas, com ExoSapIT (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as sugestões do fabricante.

**Reacção do método de Snapshot de ensaio múltiplo**

As reacções de genotipagem foram realizadas usando o método Snapshot™ (Applied Biosystems) e seguindo metodologia previamente determinada de ensaio múltiplo. Após o primeiro PCR, os produtos de reacção são misturados num único tubo, ao qual são adicionados iniciadores internos específicos para cada produto de PCR previamente produzido. Nesta segunda reacção, a extensão da cadeia a partir do iniciador faz-se numa única base nucleotídica (complementar à cadeia molde). Esta base nucleotídica é modificada de modo a não permitir a extensão da cadeia e é também marcada com fluorocromo para possibilitar a detecção da base incorporada. Assim, após separação por electroforese capilar num sequenciador ABI PRISM 3710 (Applied Biosystems), a análise dos picos correspondentes foi efectuada utilizando o programa GeneMapper™ 3.7 (Applied Biosystems).

**5.1.2. Apresentação dos resultados**

Foi pela primeira vez implementada a técnica de SnapShot. Com esta técnica foram pesquisados SNPs no cromossoma-Y, em regiões descritas na literatura (Natanaelsson *et al.*, 2006), sendo bastante útil por ser rápido na obtenção de resultados e de baixo custo.

Não se obtiveram novos polimorfismos em relação aos descritos na literatura, para os cães representativos das raças autóctones portuguesas, nem mesmo nos cães rafeiros, que usualmente, evidenciam uma elevada variabilidade genética com a aplicação de marcadores nucleares (Pires *et al.*, 2009).

Ao analisar os haplótipos obtidos para os cães e os lobos ibéricos verifica-se a presença de substituições (transversões) diagnóstico, permitindo a diferenciação destas duas espécies.

### 5.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto

A candidata implementou a técnica de detecção de SNPs (“polimorfismo de base única”) pelo método “SnapShot”, no Grupo de Biologia Molecular.

Pela primeira vez, através desta técnica, foram analisados SNPs específicos para o cromossoma-Y em amostras de raças de cães autóctones portuguesas, em populações provenientes de Espanha e do Norte de África, e em lobos oriundos da Península Ibérica (Cabrera, 1914) (*Canis lupus signatus*, Cabrera 1907). Com este método obteve-se haplótipos diagnóstico que possibilitam a diferenciação entre *Canis familiaris* e *Canis lupus signatus*.

A utilização de marcadores para o cromossoma-Y podem ajudar a complementar os estudos baseados em sequências de mtDNA e em marcadores autossómicos, para um melhor entendimento da domesticação das raças autóctones portuguesas.

Na sequência destes trabalhos, o Grupo de Biologia Molecular foi convidado a participar em várias candidaturas, entre elas, o Projecto LIFE+ Nature & Biodiversity 2010: IBERLOBO.

### 5.1.4. Indicadores de execução

Borges C., F. Simões, F.P. Fonseca, J. Matos and A.E. Pires (2009). A multiplex Snapshot assay for detection of y-chromosome snps in dogs and Iberian wolves un ensayo de snapshot multiplexado para la detección de SNPs en el cromosoma y de perros y lobo ibérico. *Archivos de Zootecnia*, **58**, Supl.1:497-499.

Pires, A.E., C. Borges, F. Simões, I.R. Amorim, F. Petrucci-Fonseca, J. Matos (2010) ‘Iberian wolf and portuguese native dog breeds: no evidences of local domestication’. 17 a 19 de Novembro, Simpósio Iberoamericano sobre Conservação. João Pessoa. Brasil. Comunicação

Borges C., Simões F., Fonseca FP., Matos J., Pires A.E. (2008) Canine y-chromosome variability in the Iberian Peninsula” Sprega. VI Congresso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animais. 18 a 28 Setembro. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Este trabalho esteve na base de uma candidatura no âmbito da investigação de ADN ancestral “História da domesticação animal na Península Ibérica: Evidências zooarqueológicas e moleculares” que obteve a classificação de Excelente, tendo sido financiada pela Fundação de Ciência e Tecnologia (PTDC/HIS-ARQ/100225/2008).

### 5.1.5. Referências bibliográficas

Cabrera, A. (1914) Fauna Ibérica: Mamíferos. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid. 441 pp.

Natanaelsson, C., Oskarsson M.C.R., Angleby H., Lundeberg J., Kirkness E., Savolainen P. (2006) Dog Y chromosomal DNA sequence: Identification, sequencing and SNP discovery". *BMC Genetics*. **7**: 45.

Pires A.E., Amorim I.R., Ginja C., Gomes M., Godinho I., Simões F., Oom M., Petrucci-Fonseca F., Matos J., Bruford M.W. (2009). Molecular structure in peripheral dog breeds: Portuguese native breeds as a case study. *Anim. Genet.* **40**(4):383-92.

Pires A.E. (2006 ) Phylogeny, Population Structure and Genetic Diversity of Dog Breeds in the Iberian Peninsula and North Africa. Dissertação de Doutoramento em Biologia Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.





# ***Capítulo 6***

## **6. Programa de Protecção e Valorização do Lobo-Ibérico no Nordeste Transmontano e Beira Alta**

4º Relatório parcelar referente aos trabalhos desenvolvidos no âmbito da Medida Compensatória MC8 do Aproveitamento Hidroeléctrico do Baixo Sabor (AHBS).

**Contextualização do Projecto:** Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos novos projectos energéticos (parques eólicos, aproveitamentos hidroeléctricos) e rodoviários na área de distribuição geográfica do lobo, em Portugal, contribuindo para o aumento do impacto humano sobre a espécie. A construção do Aproveitamento Hidroeléctrico do Baixo Sabor (AHBS), com Declaração de Impacte Ambiental (DIA) emitida a 15 de Junho de 2004, vem colocar uma nova ameaça à situação actual do lobo, particularmente, no Nordeste Transmontano, uma vez que se reconhece a importância do vale do rio Sabor como um dos principais corredores de dispersão da espécie entre o norte e o sul do distrito de Bragança (Álvares e Jambas, 2005). Assim, procedeu-se à recolha de vários dejectos da espécie nas duas margens do rio Sabor, para que fosse possível individualizar genótipos. Foi também um objectivo determinar graus de parentesco entre indivíduos, identificados através das análises genéticas, de modo a inferir o conhecimento de eventuais movimentos de lobos entre as duas margens do rio, por comparação de genótipos (iguais ou aparentados).

Os trabalhos de investigação foram desenvolvidos no âmbito da Medida Compensatória MC8 do Aproveitamento Hidroeléctrico do Baixo Sabor (AHBS) - “Programa de Protecção e Valorização do Lobo-ibérico no Nordeste Transmontano e Beira Alta”. A candidata fez parte da equipa técnica como Consultora externa, à qual foram delegadas as responsabilidades de execução técnica da Actividade C) 3.3.1. (Relatório PROCESL, 2010).

O trabalho realizou-se em 3 fases:

- 1ª fase: Amplificação de loci de microsatélites por técnicas de PCR
- 2ª fase: Sequenciação de ADN Mitocondrial
- 3ª fase: Sexagem Molecular

Para consulta mais detalhada sobre o projecto consultar documentos inseridos no anexo VI.

## 6.1. Competências adquiridas

### 6.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto

#### **Material Biológico**

Para este estudo foram amostrados 123 dejectos. Foram utilizadas as bases de dados de raças de cães portuguesas para os mesmos locus microssatélites e uma base de dados de tecidos de lobos (Relatório PROCESL, 2010).

Foram implementados procedimentos laboratoriais de assépcia associados à manipulação de amostras forenses (baixa concentração de ADN).

#### **Extracção do ADN**

Cada um dos dejectos foi manipulado individualmente, em sala de acesso condicionado, de modo a evitar contaminações externas. De cada espécime, foi retirada, com um bisturi, uma porção de película transparente envolvente, existente à superfície do dejecto, que potencialmente contém células epiteliais do intestino do indivíduo a que os dejectos correspondem. A porção de película foi então colocada em microtubo estéril, que foi fechado e imediatamente congelado a -20°C, até prosseguir com a extracção de ADN. A extracção de ADN é realizada manipulando um conjunto de 11 amostras de estudo e 1 controlo negativo (ausência de amostra biológica) por cada protocolo de extracção completo e sempre em ambiente de acesso condicionado.

A extracção do ADN dos dejectos amostrados foi efectuada com o Kit QIAamp DNA Stool (QIAGEN) com algumas modificações ao protocolo recomendado de forma a otimizar a extracção. A quantidade de partida de material biológico utilizada variou consoante a qualidade da amostra fecal, dependendo da qualidade da amostra à análise visual, uma vez que as amostras ambientais são recolhidas após terem ficado expostas a diferentes condições atmosféricas durante tempo indeterminado. Para o mesmo efeito foi também utilizado o Innuprep stool kit (AnalytiKJena) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras de ADN extraído foram armazenadas a -20 °C até à sua utilização.

#### **1ª fase: Amplificação de loci de microssatélites por técnicas de PCR**

Para a amplificação do ADN extraído dos dejectos, utilizou-se um conjunto de 19 pares de iniciadores de microssatélites marcados, dos quais 5 correspondem a repetições de dinucleotídeos (AHT121, C22.279, CXX.109, CXX.173, e CXX.225), 13 correspondem a repetições de tetranucleotídeos (FH2001, FH2054, FH2247, FH2010, FH2159, FH2611 e PEZ08), (Pires *et al.* 2009), FH2361 (Mellersh *et al.*, 1997), FH4012, FH3210 and REN247M23 (Guyon *et al.*, 2003), PEZ08 e PEZ06, (Neff *et al.*, 1999), C38 (Van Asch *et al.*, 2009) e 1 hexamérico VWF.X (Shibuya *et al.*, 1994).

### **Análise de fragmentos**

A genotipagem dos 19 loci de microssatélites foi processada em sequenciador automático Applied Biosystems 3130 Avant. A análise dos fragmentos detectados foi efectuada utilizando o software GeneMapper v3.7.

### **Métodos da análise de resultados**

Os genótipos obtidos para o total dos dejectos (123) foram analisados em conjunto com a base de dados de raças de cães portuguesas para os mesmos loci microssatélites (gentilmente cedidas pela Dra. Ana Elisabete Pires (Pires *et al.*, 2006), para determinar a probabilidade do dejecto analisado pertencer a uma população canina. Em paralelo, utilizou-se uma base de dados de tecidos de lobos (gentilmente cedida pela Dra. Isabel do Rosário), à qual se adicionaram genótipos de lobos do Centro de Recuperação do Lobo Ibérico. Para todas as análises foi construída a respectiva tabela de output, considerando 19 loci e 5 populações: cães, lobos, dejectos da margem direita, dejectos da margem esquerda e dejectos a sul do Douro, num total de cerca de 99 genótipos (dos quais 50 dejectos com pelo menos 16 loci).

Os parâmetros estatísticos foram obtidos através da análise de genótipos utilizando o software GenAlex 6.3 (Peakall *et al.*, 2006). A possível relação de parentesco entre os vários genótipos obtidos foi testada utilizando o software M-L relate (Kalinowski *et al.*, 2006).

A distribuição de genótipos por população foi testada utilizando o software Structure 2.3. (Pritchard *et al.*, 2000). Esta análise que utiliza uma metodologia Bayesiana de cálculo e o programa foi executado sem definir previamente a origem específica de cada amostra. Para cada análise, foram efectuadas  $10^6$  cadeias Markov Monte Carlo (MCMC) após  $10^4$  cadeias MCMC.

### **2ª fase: Sequenciação de ADN Mitocondrial**

#### **Amplificação de um fragmento do ADN mitocondrial**

Todas as amostras de ADN de dejectos, sangue, pêlo e alguns tecidos, foram sujeitas a PCR, de modo a amplificar um fragmento do ADN mitocondrial de cerca de 450 bp. A reacção de amplificação foi efectuada utilizando iniciadores de PCR THRL (5'-GAA TTC CCC GGT CTT GTA AAC C-3') e DLH (5'-CCT GAG GTA AGA ACC AGA TG-3') (Hailer e Leonard., 2008).

As amostras foram analisadas em gel de agarose a 1,5% (p/v) e a banda correspondente ao fragmento mitocondrial foi extraída e purificada utilizando o Kit DNA and Gel Band Purification GFX™ PCR (Amersham Biosciences).

### **Sequenciação**

A banda purificada foi sequenciada num Genetic Analyser Abi-Prism 3100 (Applied Biosystems).

### **Métodos da análise de resultados**

Após sequenciação, as sequências foram analisadas quanto à semelhança com ADN mitocondrial de *Canis lupus signatus*, utilizando o algoritmo BLAST e o banco de sequências GENBANK do NCBI.

### **3ª fase: Sexagem Molecular**

#### **Amplificação de um fragmento do ADN**

Todas as amostras de ADN de dejectos, sangue, pêlo e alguns tecidos, foram sujeitas a PCR, de modo a amplificar um fragmento do ADN de cromossoma Y de cerca de 100 bp. A reacção de amplificação foi efectuada utilizando iniciadores de PCR SRY F (5'-GAACGCATTCTTGGTGTGGTCTC-3') e SYR R (5'-GGCCATTTTTCGCTTCTGTAAG-3').

Os produtos de PCR foram analisados por gel de agarose a 1,5% (p/v), e a presença de uma banda aos 100 bp foi interpretada como amplificação do fragmento do cromossoma-Y e foi atribuída à amostra a classificação de Macho (M).

### **6.1.2. Apresentação dos resultados**

O trabalho com amostras não invasivas, como dejectos, requer no mínimo 2-3 extracções para assegurar a validação dos resultados obtidos. Os resultados desta análise estão directamente correlacionados com o estado físico do dejecto, tendo-se verificado que as amostras recolhidas no período de Outubro a Dezembro apresentam um estado físico mais degradado do que as recolhidas no período de Verão.

Em relação aos resultados obtidos, verifica-se que apenas 5 dejectos (4 da margem esquerda e 1 da margem direita) se posicionam no espaço ocupado pelos genótipos da base de dados de tecido de lobo. Todas as outras amostras se deslocam para o espaço ocupado pelos genótipos da população de cão. A análise de filiação entre lobo e cão, realizada com os mesmos genótipos identificou apenas um indivíduo a partilhar o genoma do lobo e de cão numa proporção de cerca de 40:60 respectivamente. Todas as outras 44 amostras de dejectos associadas ao agrupamento dos cães em análise apresentaram valores de associação ao genoma de cão muito próximos de 100%. Por outro lado, as 5 amostras de dejectos associadas ao agrupamento dos lobos em análise apresentaram valores de associação ao genoma de lobo muito próximos de 100%. Quando se realiza a análise bayseana confrontando amostras de

dejectos apenas com o conjunto de tecidos de lobo, verificamos a confirmação da filiação dos 5 dejectos atrás mencionados em lobo, e o dejecto com diferentes proporções lobo:cão é drasticamente eliminado da filiação em lobo. Com base na análise dos dejectos utilizando 19 loci de microssatélites, não foram encontradas evidências de um mesmo indivíduo passar de uma margem para a outra do rio Sabor. Do total de 50 dejectos verificou-se que apenas 5 são afiliados na população de lobo, com percentagens de partilha do genoma muito próximo de 100%. Dos 5 dejectos identificados como dejectos de lobo, apenas 2 colhidos na margem esquerda apresentaram relação de parentesco equivalente a irmãos ou pai/mãe-filho.

No que respeita à análise do ADN mitocondrial, as sequências que apresentavam identidade máxima superior a 98% com sequências mitocondriais de lobo foram classificadas como sequências de lobo. As sequências com maior identidade correspondem, aos números de acesso DQ480505.1, GQ376507.1, GQ376506.1, AF008137.1, GQ376375.1, GQ376374.1, GQ376363.1, GQ376306.1, GQ376305.1, GQ376271.1, GQ376270.1.

Só dois dos dejectos afiliados em lobo pelos microssatélites foram confirmados com a sequência do ADN mitocondrial. A sequenciação de ADN mitocondrial em dejectos revelou-se complexa, uma vez que se detectou a co-amplificação e co-sequenciação de fragmentos amplificados no meio de reacção. A utilização de iniciadores de sequenciação mais internos ao fragmento não resolveu o problema. No entanto, nas amostras em que a sequenciação funcionou, não se verificou incongruências com a afiliação determinada pelos microssatélites.

No que respeita à sexagem, foram determinados 2 machos e 3 fêmeas para os dejectos afiliados em lobo.

### **6.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto**

Relativamente aos objectivos do projecto verificou-se que após a realização das análises genéticas aos dejectos colhidos, apenas foram confirmados 5 dejectos como sendo de lobo. Os resultados tendem a evidenciar que a presença de lobo na área próxima ao AHBS possa ser mais ténue do que originalmente era expectável. Apesar dos dejectos atribuíveis a lobo se distribuírem por três zonas diferentes, atribuíveis, a três alcateias distintas, o facto é que o seu escasso número pode revelar que se tratam de alcateias instáveis, com pouco indivíduos, facto igualmente corroborado pelo reduzido número de prejuízos no gado nas freguesias próximas ao rio Sabor, com excepção das freguesias de Souto da Velha e Talhinhos.

Como se pode verificar, uma vez que a base da recolha de dejectos no campo é o reconhecimento físico do dejecto pelo técnico, não podemos afirmar que todos os dejectos recolhidos pertencem apenas à espécie lupina, pois é conhecida a dificuldade de reconhecimento apenas pelas características físicas do dejecto. Assim, as análises genéticas vêm complementar esta informação validando os resultados, sendo uma mais valia para este tipo de estudos de impacto ambiental.

#### 6.1.4. Indicadores de execução

PROCESL, (2010). "Aproveitamento Hidroelétrico do Baixo Sabor - Programa de Protecção e Valorização do Lobo-ibérico no Nordeste Transmontano e Beira Alta", 4º Relatório Parcelar 95pp. (Relatório confidencial)

#### 6.1.5. Referências bibliográficas

- Álvares F. e Jambas J. (2005) "Caracterização da Situação Actual do Lobo-Ibérico na Área de Implantação da Barragem do Baixo Sabor (Trás-os-Montes)". CIBIO.
- Guyon R., Lorentzen TD., Hitte C., Kim L., Cadieu E. (2003) A 1-Mb resolution radiation hybr-id map of the canine genome". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**:5296-5301.
- Hailer F. e Leonard, J.A. (2008) Hybridization among three native North American *Canis* species in a region of natural sympatry. *PLoS ONE*, **3**(10):e3333.
- Kalinowski S.T., Wagner A.P., Taper M.L. (2006) ML-Relate: a computer program for maxi-mum likelihood estimation of relatedness and relations. *Molecular Ecology Notes* **6**:576-579.
- Mellersh C.S., Langston A.A., Acland G.M., Fleming M.A., Ray K., Wiegand N.A., Ostrander, E.A. (1997). A linkage map of the canine genome. *Genomics*, **46**: 326-336.
- Neff M.W., Broman K.W., Mellersh C.S., Ray K., Acland G.M., Aguirre G.D., Ziegle J.S., Ostrander E.A., Rine J. (1999) A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*", *Genetics* **151**:803–820.
- Peakall, R., Smouse, P.E., (2006). "GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic soft-ware for teaching and research". *Molecular Ecology Notes* **6**, 288-295.
- Pires A.E., Amorim I.R., Ginja C., Gomes M., Godinho I., Simões F., Oom M., Petrucci-Fonseca F., Matos J., Bruford M.W. (2009) Molecular structure in peripheral dog breeds: Portu-guese native breeds as a case study. *Animal Genetics*, **40**(4):383-392.
- Pires A.E., Ouragh L., Kalboussi M., Matos J., Petrucci-Fonseca F., Bruford M.W. (2006) "Mitochondrial DNA sequence variation in Portuguesenative dog breeds: diversity and phylogeneticaffinities". *J. Hered.*, **97**: 318-330.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of Population Structure Using Multi-locus Genotype Data" *Genetics* **155**: 945-959.
- Shibuya H.B., Collins K., Huang T.H., Johnson G.S. (1994) A polymorphic (AGGAAT)*n* tandem repeat in an intron of the canine von Willebrand factor gene. *Anim. Genet.* **25**:122.
- Van Asch B., Alves C., Santos L., Pinheiro R., Pereira L., Gusmão L., Amorim A. (2010) Genetic profiles and sex identification of found-dead wolves determined by the use of an 11-loci PCR multiplex *Forensic. Sci. Int. Genet.*, **4**(2):68-72.





# ***Capítulo 7***

### **7. Projecto de Investigação: Genotipagem da população de lobo ibérico em Portugal**

No âmbito de um protocolo do Grupo de Biologia Molecular com o “Grupo Lobo” da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, têm estado a ser desenvolvidos vários métodos de análise molecular de cães e lobos, visando a genotipagem de todos os animais amostrados, com o objectivo de identificar a espécie com base em dejectos, considerados amostras ambientais não invasivas, permitindo a diferenciação genética entre *Canis familiaris* e *Canis lupus signatus*.

**Contextualização do projecto:** Na Península Ibérica existe uma subespécie do lobo cinzento, o lobo ibérico, denominado *Canis lupus signatus* Cabrera, 1907.

A população lupina, que no início deste século ocupava a quase totalidade de Portugal, a partir dos anos 20-30 sofreu uma acentuada regressão da sua área de distribuição, bem como dos seus efectivos populacionais (Petrucchi-Fonseca, 1990).

Em Portugal, os lobos ocupam principalmente as regiões montanhosas do norte e centro, que constituem o Parque Nacional da Peneda-Gerês, o Parque Natural de Montesinho e o Parque Natural do Alvão, visto que possuem baixos índices de densidade populacional, zonas de agricultura e intensa actividade pecuária (Pimenta *et al.*, 2005).

De acordo com o último censo nacional de lobo, efectuado em 2002/2003, a população lupina em Portugal distribui-se por cerca 20.000 Km<sup>2</sup>, sendo estimada em 65 alcateias, o que corresponde aproximadamente a 300 lobos. Às causas históricas do declínio das populações lupinas, como sejam a sua perseguição directa e a das suas presas selvagens pelo Homem, acrescem, nos últimos anos, as alterações de habitat, devido sobretudo à destruição da floresta, e a diminuição do número de cabeças de gado, devido ao abandono da pastorícia tradicional (Petrucchi-Fonseca, 1993; 1995).

Continuam a ser comuns as mortes por envenenamento e por armas de fogo, a captura com armadilhas, assim como, a remoção das crias das tocas (Petrucchi-Fonseca, 1993). A perseguição directa movida por pastores e caçadores, caça furtiva com armas de fogo, armadilhas e veneno, deve-se à crença generalizada que o lobo ataca o Homem e os animais domésticos.

O número crescente de caçadores exercendo o seu direito legal de batida ao lobo não trouxe sinais de melhoria na década de 40 e a extinção do lobo ameaçava tornar-se uma realidade a curto prazo (Nunes, 2000). Em Portugal, só apenas na década de 90 é que o lobo passou a beneficiar do estatuto de protecção total através da lei nacional de protecção do lobo ibérico (Decreto-Lei 90/88 de 13 de Agosto). Desde então é proibida a sua captura e abate, a destruição do seu habitat e a sua perturbação, principalmente na época de reprodução, e os prejuízos por ele causados são recompensados (Malveiro, 2006). Citando Luís Moreira (1998) ...“de todos os países da Europa, Portugal é o que paga, actualmente, o maior montante de

indemnizações relativas a prejuízos causados por lobo nos animais domésticos, apesar de ter uma das populações de lobo mais pequenas”.

A escassez de presas naturais, provocada pela excessiva pressão cinegética sobre os cervídeos e pela destruição do seu habitat, leva a que, de facto, os lobos por vezes ataquem os animais domésticos (Moreira, 1992; Petrucci-Fonseca, 1990). No entanto, em áreas onde as presas naturais abundam, os prejuízos provocados pelo lobo no gado são quase inexistentes (Haaften, 1983; Moreira, 1992). Ao mesmo tempo, pensa-se que presentemente existam centenas de cães abandonados a vaguear pelo país, que competem com o lobo na procura de alimento e que com ele podem hibridar, sendo provavelmente responsáveis por muitos dos ataques a animais domésticos incorrectamente atribuídos ao lobo.

Nesta linha de trabalho pretendeu-se aumentar a amostragem do número de cães para estes 19 loci (amostras cedidas gentilmente pela Dra Elisabete Pires, INRB) e a amostragem de tecidos de lobos (amostras cedidas gentilmente pela Dra Isabel Amorim, Grupo Lobo), com vista à partilha de bases de dados de genótipos da população canina de Portugal para os locus de microssatélites seleccionados, o que permitirá testes de "assignment" (identificação) para as espécies *Canis familiaris* e *Canis lupus*. Esta base de dados (embora na altura com uma amostragem reduzida) foi utilizada para a identificação de amostras ambientais não invasivas (dejectos e pêlos), recolhidas em zonas de ocupação de lobo ibérico.

O trabalho realiza-se em 3 fases:

- 1ª fase: Amplificação de loci de microssatélites por técnicas de PCR para amostras não invasivas
- 2ª fase: Sequenciação de ADN Mitocondrial
- 3ª fase: Sexagem Molecular

## 7.1. Competências adquiridas

### 7.1.1. Metodologias aplicadas no desenvolvimento do projecto

#### **Material Biológico**

Foram colhidas 300 amostras ambientais (dejectos) que cobrem as áreas de Alvão, Padrela, Bornes, Alto da Coutada e Montesinho.

A metodologia que neste momento está a ser aplicada pela candidata é similar à utilizada no Projecto de Investigação: Aproveitamento Hidroeléctrico do Baixo Sabor - Programa de Protecção e Valorização do Lobo-ibérico no Nordeste Transmontano e Beira Alta (Capítulo 6).

### 7.1.2. Apresentação dos resultados

Os resultados estão a ser processados.

### 7.1.3. Impacto dos resultados obtidos no projecto

Em estreita colaboração com o Doutor Petrucci- Fonseca (Grupo Lobo), pretende-se actuar no terreno através da implementação de um sistema de recolha de amostras (zaragatoas) do prejuízo, às quais se aplicarão análises genéticas que permitirão diferenciar *Canis familiaris* de *Canis lupus signatus*. Desta forma o Estado basear-se-á na análise científica, aquando do pagamento das indemnizações relativas a prejuízos causados apenas por lobos.

Os dados obtidos poderão também ser utilizados para a avaliação da diversidade natural do lobo ibérico e sua conservação.

### 7.1.4. Referências bibliográficas

Cabrera A. (1914) Fauna Ibérica: Mamíferos. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid. 441 pp

Haafte V.J.L., Petrucci-Fonseca F., Pereira M. (1983) - A wolf study in Portugal. Proceedings of the XVI Congress of Game Biologists (Strbské Pleso): 550-553.

Lei nº90/88 de 13 de Agosto: Protecção do Lobo Ibérico – bases para a protecção, conservação e fomento do lobo ibérico, definição de regras relativas à protecção, detenção, transporte, comercialização e exposição, prevenção quanto à utilização de meios de extermínio, controlo de cães assilvestrados e regras de responsabilidade.

Lei nº 139/90 de 27 de Abril: Regulamenta o estabelecido na Lei nº 90/88.

Malveiro E.S.A. (2006) Estudo genético do lobo ibérico: utilização de microssatélites no estudo populacional, na identificação individual e nas relações de parentesco. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

Moreira L. M. (1992). Contribuição para o Estudo da Ecologia do Lobo (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907) no Parque Natural de Montesinho. Relatório de estágio para a obtenção de Licenciatura em Recursos Faunísticos e Ambiente. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 175 pp.

Pimenta V., Barroso I., Álvares F., Correia J., Ferrão da Costa G., Moreira L., Nascimento J., Petrucci-Fonseca F, Roque & E. Santos S. (2005). Situação populacional do lobo em Portugal: resultados do censo nacional 2002/2003. Instituto da Conservação da Natureza, Grupo Lobo, Lisboa, 158pp.

Petrucci-Fonseca F. (1990) O lobo (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907) em Portugal. Problemática da sua conservação. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 392 pp.

### Outras Actividades na área Profissional:

Na sequência de um projecto Ciência Viva /1004, o Grupo de Biologia Molecular do ex-INETI, onde a candidata está integrada, foi subcontratado pelo ministério da Educação (em colaboração com a Ordem dos Biólogos) para produzir 1074 kits de Biologia Molecular para as actividades da disciplina de Biologia do 12º ano. Este kit de Biologia Molecular incluiu uma tina de electroforese com concepção particular não profissional, um transformador para uma diferença de potencial de 45 V, células bacterianas para experiência de extracção de ADN, tubos de amostras de ADN plasmídico, tubos de ADN amplificado para electroforese e teste de paternidade (experiência “CSI”), pontas de micropipeta, micropipeta adaptada, tubos eppendorf, tampão TBE, Agarose, etanol e corante para ADN. Este kit permite realizar na escola experiências de electroforese de ADN sem utilização de substâncias mutanogénicas e cancerígenas ou radiação UV.

**Participação:** Concepção da pipeta adaptada, concepção dos iniciadores de amplificação para os fragmentos inseridos na experiência CSI incluída no kit, prospecção de materiais e encomenda de todo o material disponível. Preparação do material biológico (produtos de 4 fragmentos de tamanhos diferentes para a experiência de “CSI” do kit).

- Demonstração de técnicas na área da biologia molecular, associado ao programa Ciência Viva, representando o INETI, realizado no Parque das Nações **(Abril de 2002)**.
- Acção de formação no IV Curso teórico prático em Biologia Molecular realizado no Departamento de Biotecnologia do INETI **(9 a 13 de Dezembro de 2002)**.
- Acção de formação no V Curso teórico prático em Biologia Molecular realizado no Departamento de Biotecnologia do INETI **(20 a 24 de Janeiro de 2003)**.
- Preparação do curso e leccionamento. “Kits para Aulas Práticas de Biologia Molecular no Ensino Secundário”, a professores de 12º ano, ao abrigo do programa Ciência Viva, Ordem dos Biólogos (250 Horas).

### **Análise Crítica do Percurso Profissional e sua Adequação ao Grau de Mestre**

Ao longo do percurso profissional a candidata adquiriu competências que lhe possibilitaram trabalhar em projectos que requerem serviços especializados: implementação de técnicas de análise de ADN, desde a extracção de ADN a partir de amostras diversas, tais como folhas, sangue, penas, tecido e dejectos com o subsequente tratamento e análise dos resultados através de bioinformática.

A experiência da candidata contribuiu decisivamente para a execução experimental de algumas das tarefas adstritas aos vários projectos descritos.

A participação em vários projectos científicos permitiram-lhe adquirir, para além duma considerável experiência laboratorial, autonomia e capacidade conceptual, capacidade de adaptação a novas situações, integrando-se facilmente no trabalho de equipa, que a levaram a desenvolver uma grande confiança e motivação para a investigação científica.

A candidata pensa que as provas dadas em termos da experimentação científica, interesse e aptidão para a investigação, nomeadamente relacionada com análises genéticas com marcadores moleculares, conferem-lhe as competências técnicas e emocionais para prosseguir com a sua intervenção em projectos nesta área científica.

A candidata realizou trabalho de mérito científico participando activamente no desenvolvimento das estratégias a seguir, conduzindo a sua participação nos projectos à publicação de artigos científicos, que validaram o trabalho efectuado.

# ***Anexos***